

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 1월 6일 (06.01.2022)



(10) 국제공개번호
WO 2022/005143 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
A01N 63/25 (2020.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008125
- (22) 국제출원일: 2021년 6월 28일 (28.06.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0079097 2020년 6월 29일 (29.06.2020) KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)
[KR/KR]: 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김진철 (KIM, Jin-Cheol); 61105 광주시 북구 비엔날레로155번길 9 103동 1403호, Gwangju (KR). 리 뒤캥 (LE, Duy Khanh); 61183 광주시 북구 설죽로 202번길 67 1-201, Gwangju (KR). 김보라 (KIM, Bo Ra); 62247 광주시 광산구 장덕로 138 107동 303호, Gwangju (KR). 유난희 (YU, Nan Hee); 62029 광주시 서구 엄화

로45번길 17 109동 104호, Gwangju (KR). 이철원 (LEE, Chul Won); 61706 광주시 남구 효사랑길 14 109동 401호, Gwangju (KR). 김주은 (KIM, Ju Eun); 58324 전라남도 나주시 그린로 328 110동 504호, Jeollanam-do (KR).

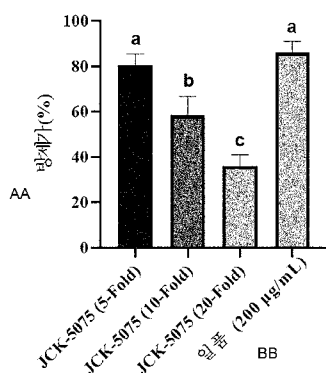
(74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

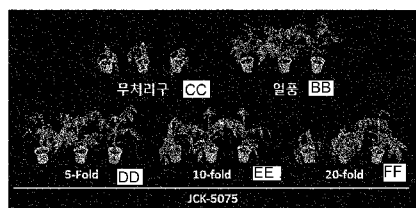
(54) Title: COMPOSITION FOR CONTROLLING BACTERIAL PLANT DISEASE, COMPRISING CULTURE MEDIUM OF PAENIBACILLUS ELGII JCK-5075 STRAIN OR EXTRACT THEREOF, METHOD FOR PRODUCING COMPOSITION, AND METHOD FOR CONTROLLING BACTERIAL PLANT DISEASE

(54) 발명의 명칭: 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for controlling a bacterial plant disease, comprising a culture medium of a *Paenibacillus elgii* JCK-5075 strain or an extract thereof, a method for producing the composition, and a method for controlling a bacterial plant disease, and can be effectively used to control a bacterial plant disease, as anti-bacterial activity is significantly more excellent when a causative bacteria of a bacterial plant disease is treated with a culture medium of the strain or an extract thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 페니바실러스 엘지아이 (*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법에 관한 것으로서, 상기 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 식물세균병 원인균에 처리하였을 때 항세균 활성이 월등히 우수하므로, 이를 효과적으로 식물세균병의 방제에 이용할 수 있다.



AA ... Control value (%)
BB ... Ilpum
CC ... Untreated group
DD ... 5-Fold
EE ... 10-Fold
FF ... 20-Fold

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액
또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의
제조방법 및 식물세균병 방제 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 농촌진흥청의 지원 하에서 고유과제번호 1395066554, 과제번호 PJ015296042020에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 농촌진흥청, 연구사업명은 "과수화상병 등 현안문제 병해충 피해 경감 기술 개발(R&D)", 연구과제명은 "항균활성 및 유도저항성 기작의 길항미생물을 이용한 화상병 방제기술 개발", 주관기관은 전남대학교산학협력단, 연구기간은 2020-02-01~2020-12-31이다.
- [2] 본 특허출원은 2020년 6월 29일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0079097호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3] 본 발명은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 항세균활성을 갖는 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 및 이로부터 분리한 펩티펩틴(Pelgipectins)에서 확인된 식물세균병 원인균에 대한 방제 효과에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 작물에 있어서 진균에 의한 식물병이 더 많고 심각한 피해를 일으키지만, 전세계적으로, 특히 습하고 더운 지역에서는 몇몇의 세균에 의한 피해도 매우 심각하다. 과학적 및 경제학적으로 전세계적으로 중요한 10가지 식물병원 세균을 2012년에 기술하였는데, 이에는 슈도모나스 시린개 패소바(*Pseudomonas syringae* pathovars), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 잔토모나스 오리제 패소바 오리제(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바(*Xanthomonas campestris* pathovars), 잔토모나스 엑소노포디스 패소바(*Xanthomonas axonopodis* pathovars), 어위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*), 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*), *Dickeya* (*dadantii* and *solani*), 및 펙토박테리움 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum*) 등이 속한다.
- [5] 세균에 의한 식물병은 다음의 세가지 이유로 인하여 방제가 매우 어렵다. 1) 최적의 환경하에서 매우 빠르게 증식한다는 것, 2) 토양매개 병원성 세균의 방제를 위한 훈증제가 부재하다는 것, 3) 많은 식물병원 세균은 식물체 내에 서식하는 반면에 많은 방제제는 식물체 표면에 처리된다는 것.

- [6] 지난 수십년 동안에 세균병을 방제하기 위하여 항생물질과 동화합물 등과 같은 화학적 방제 방법을 사용하여 왔으나, 반복적인 사용으로 토양환경의 오염, 유익한 미생물의 감소, 잔류 독성 및 내성 균주 발생 등의 문제점이 발생하였다. 이에 따라 화학농약을 대체하기 위하여 미생물 및 천연물질을 이용한 생물학적 제제가 대안으로 제시되어 많은 연구가 진행되었다. 하지만, 생물학적 제제의 효능 및 종류는 아직 충분하지 않으므로 더 우수한 생물학적 제제의 개발이 요구되고 있다.
- [7] 페니바실러스(*Paenibacillus*) 속은 그람양성, 호기성, 막대형, 내생포자 형성 세균이다. 상기 그룹의 주요 특성은 중성 및 알칼리 성장 조건에서 세포외 효소의 분비이다. 일부 종은 또한 다당류, 아미노산 및 이차 대사 산물, 예를 들면, 항생물질, 색소, 독소, 효소 저해제, 페로몬 및 식물 및 동물 성장 촉진제를 생산할 수 있다.
- [8] 페니바실러스 속은 현재로 많은 연구의 주제이며, 이의 항균활성은 다양한 스펙트럼의 미생물에 대해 확인되었다. 일부 페니바실러스 균주는 식물병의 생물방제에 이용되었으며, 곰팡이 세포벽에 존재하는 주요 화합물인 키틴을 분해하는 능력 때문에 항균 생물방제제로서 중요하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 식물세균병 원인균에 처리하였을 때 항세균 활성이 월등히 우수한 것을 확인하였다.
- [10] 이에, 본 발명의 목적은 항세균활성을 갖는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주를 배양하여 배양액을 제조하는 배양 단계를 포함하는 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물을 식물체에 처리하는 처리 단계를 포함하는 식물세균병 방제 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 식물세균병 방제 용도에 관한 것이다.

기술적 해결 방법

- [15] 본 발명은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액

또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 식물세균병 방제용 조성물은 식물세균병 원인균에 처리하였을 때 우수한 항세균 활성을 나타낸다.

[16] 본 발명자들은 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 식물세균병 원인균에 처리하였을 때 항세균 활성이 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[17] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[18] 본 발명의 일 양태는 항세균 활성을 갖는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주이다.

[19] 본 발명의 다른 양태는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물이다.

[20] 본 명세서상의 용어 “배양액”은 미생물을 배양한 후 상기 미생물을 포함한 것을 의미한다. '배양 상층액'은 원심분리 방법을 통해 배양액으로부터 대부분의 미생물을 제거한 획득한 상층의 액을 의미하며, '상징액'이라고도 한다. '배양여액'은 원심분리 및 여과를 수행함으로써 배양액으로부터 세균을 완전히 제거한 것을 의미한다.

[21] 본 발명에 있어서 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레애(*Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*, 호접란 세균성갈색점무늬병 원인균), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*, 오이 검은점무늬병 원인균), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*, 뿌리혹병 원인균), 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*, 벼 세균성알마름병 원인균), 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, 배추 무름병 원인균), 펙토박테리움 크리산썰미(*Pectobacterium chrysanthemi*, 국화 세균성마름병 원인균), 어위니아 피리폴리에(*Erwinia pyrifoliae*, 사과나무 검은가지마름병 원인균), 어위니아 캐로토보라(*Erwinia amylovora*, 사과나무 화상병 원인균), 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디애(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 키위 궤양병 원인균), 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, 오이 반점세균병 원인균), 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, 복숭아 세균성구멍병 원인균), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*, 감귤 궤양병 원인균), 잔토모나스 유베시카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*, 고추 세균성점무늬병 원인균), 잔토모나스 오리재 패소바 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 벼 흰잎마름병 원인균), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*, 토마토 세균성꽃마름병 원인균) 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 토마토 궤양병 원인균)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것일 수 있다.

- [22] 본 발명에 있어서 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액의 추출물은 PGP(Pelgipeptin)-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 함유하는 것일 수 있고, 바람직하게는 PGP-A, PGP-C 및 PGP-D인 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 양태는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주를 배양하여 배양액을 제조하는 배양 단계를 포함하는 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법이다.
- [24] 본 발명에 있어서 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레에, 아시도보락스 콘자시, 아그로박테리움 튜머파시엔스, 벌크홀데리아 글루메, 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라, 펙토박테리움 크리산썰미, 어위니아 피리폴리에, 어위니아 캐로토보라, 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디에, 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스, 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니, 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리, 잔토모나스 유베시카토리아, 잔토모나스 오리제 패소바 오리제, 랄스토니아 솔라나세아룸 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명에 있어서 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법은 다음과 같은 분획 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다:
- [26] 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 배양액으로부터 제1 활성분획을 획득하는 제1 분획 단계; 및
- [27] 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 제2 활성분획을 획득하는 제2 분획 단계.
- [28] 상기 제1 분획 단계는 에탄올:중류수 = 0~100:100~0의 농도구배에 따라 전개하여 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로, 에탄올:중류수의 농도구배를 이용하여 제1 활성분획을 획득하는 과정은 순차적으로 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 및 100:0인 것일 수 있다.
- [29] 상기 제2 분획 단계는 제1 분획 단계에서 생성된 6개의 제1 활성분획 중 1개 이상을 선택하여 수행되는 것일 수 있다. 바람직하게, 6개의 활성분획 중 5번째 활성분획(에탄올:중류수 = 80:20)을 선택하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명의 또 다른 양태는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물을 식물체에 처리하는 처리 단계를 포함하는 식물세균병 방제 방법이다.
- [31] 본 발명에 있어서 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레에, 아시도보락스 콘자시, 아그로박테리움 튜머파시엔스, 벌크홀데리아 글루메, 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라, 펙토박테리움 크리산썰미, 어위니아 피리폴리에, 어위니아 캐로토보라, 슈도모나스 시린개 패소바

액티니디에, 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스, 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니, 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리, 잔토모나스 유베시카토리아, 잔토모나스 오리재 패소바 오리재, 칼스토니아 솔라나세아룸 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것일 수 있다.

[32] 본 발명에 있어서 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액의 추출물은 PGP-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 함유하는 것일 수 있고, 바람직하게는 PGP-A, PGP-C 및 PGP-D인 것일 수 있다.

[33] 본 발명에 있어서 식물세균병 방제 방법의 처리 단계는 토양관주, 토양관수, 엽면분무, 수간주사, 경엽 처리, 근권 처리 및 종자 처리로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방식으로 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 토양관주인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[34] 본 발명은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법에 관한 것으로서, 상기 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 식물세균병 원인균에 처리하였을 때 항세균 활성이 월등히 우수하므로, 이를 효과적으로 식물세균병의 방제에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 나타낸 계통도이다.

[36] 도 2a는 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액의 토마토 풋마름병에 대한 방제효과를 나타낸 그래프 및 사진이다.

[37] 도 2b는 항세균활성 물질 PGP(Pelgipeptin)-C의 토마토 풋마름병에 대한 방제효과를 나타낸 그래프 및 사진이다.

[38] 도 3a는 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액의 배추 무름병에 대한 방제효과를 나타낸 그래프 및 사진이다.

[39] 도 3b는 항세균활성 물질 PGP-A의 배추 무름병에 대한 방제효과를 나타낸 그래프 및 사진이다.

[40] 도 4는 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액의 고추 세균성점무늬병에 대한 방제효과를 나타낸 그래프 및 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[41] 본 발명은 항세균활성을 갖는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[42] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들

실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

- [43] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[44]

- [45] 실시예 1: 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 분자생물학적 분석 및 계통도 분석

- [46] 본 발명을 통해 토양으로부터 분리한 균주는 16s rDNA의 염기서열 분석을 통해 분자생물학적으로 동정하였다. 균주를 TSA(Tryptic soy agar) 배지에 접종한 다음 30°C에서 1일 동안 150 rpm으로 진탕배양하였다. 추출 키트(I-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit, iNtRON)를 이용하여 프로토콜에 따라서 균주의 게놈 DNA(gDNA)를 추출하였다.

- [47] 구체적으로, 균주의 추출된 gDNA와 인트론 바이오테크놀로지(iNtRON Biotechnology)의 PCR-프리믹스(Polymerase chain reaction-premix), 그리고 균주의 16s rDNA를 증폭할 수 있는 하기 표 1의 프라이머 세트 9F/1512R를 혼합한 후 PCR을 통해 유전자를 증폭하였다.

- [48] [표1]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
1	9F primer	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
2	1512R primer	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT

- [49] PCR은 95°C 5분을 시작으로 95 °C 30초, 55°C 30초 및 72°C 30초를 30번 반복한 후, 72°C 7분, 12°C에서 증폭을 끝냈다. 증폭된 16s rDNA PCR 산물의 염기서열 분석을 제노텍(대전, 대한민국)에 의뢰하여 염기서열을 얻었다.

- [50] NCBI의 BlastN 검색을 이용하여 GenBank 데이터베이스의 염기서열을 비교한 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 JCK-5075 균주는 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*)로 동정되었으며, 상기 균주를 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075로 명명하였다.

[51]

- [52] 실시예 2: 항세균활성 물질의 분리 및 구조 동정

- [53] 본 발명의 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주가 생산하는 항세균활성 물질을 분리하기 위해, 상기 균주를 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 접종한 다음 30°C에서 3일간 150 rpm으로 진탕배양하였다. 상기 진탕배양한 배양물을 4,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 배양 상층액 400 ml을 얻었다.

- [54] 상기 배양 상층액을 다이아이온(Diaion) HP-20 컬럼(7.5 cm 컬럼 내경 x 26 cm 컬럼 길이, IONTEC, 대한민국)에 가한 다음 0%(v/v), 20%(v/v), 40%(v/v),

60%(v/v), 80%(v/v) 및 100%(v/v) 에탄올 용매(에탄올:증류수 = 0~100:100~0)로 각각 1.6 L씩 용출하여 분획물을 감압 농축하였다.

[55] 더욱 순화하기 위하여 이 중 80% 에탄올 분획을 ShimPack C18(20 x 250 mm) 컬럼이 장착된 분취용 HPLC(Shimadzu, Japan)를 이용하였다. 용출용매는 0.05% 트리플루오르초산(TFA)이 첨가된 증류수 및 아세트나이트릴을 이용하였으며, 30%부터 46%의 0.05% 트리플루오르초산(TFA)이 첨가된 아세트나이트릴을 25분 동안 유속 10 ml/min으로 용출하였다. 활성물질은 PDA(Photodiode Array) 디텍터로 검출하였으며 검출파장은 230 nm에서 확인하였다.

[56] 상기 80% 에탄올 분획은 PGP 복합물질로서, m/z 1073.3, 1011.6, 1087.3 및 1087.2 Da에서 [M+H]⁺이온 피크를 포함하는 PGP를 함유하였고, 머무름시간(retention time)을 기준으로 이를 각각 PGP-A, B, C 및 D로 각각 순수 분리하였다.

[57] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075로부터 항세균 활성물질인 PGP(Pelgipeptins)-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D를 분리하였고, 분리된 물질은 동결건조하여 양이온 모드의 액체 크로마토그래피 전기분무 질량분석법(LC-ESI-MS, API2000, AB SCIEX, USA)을 통해 분자량을 확인하였다.

[58]

[59] 실시예 3: 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양여액 및 항세균활성 물질의 다양한 식물병원균에 대한 인 비트로(*in vitro*) 항세균활성 검정

[60] 3-1. 16종 식물병원성 세균 배양액의 준비

[61] 식물병원성 세균으로 15종의 그람음성 세균(아시도보락스 아베네 아종 카틀레아(*Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*, 호접란 세균성갈색점무늬병 원인균), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*, 오이 검은점무늬병 원인균), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*, 뿌리혹병 원인균), 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*, 벼 세균성알마름병 원인균), 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, 배추 무름병 원인균), 펙토박테리움 크리산썰미(*Pectobacterium chrysanthemi*, 국화 세균성마름병 원인균), 어위니아 피리폴리아(*Erwinia pyrifoliae*, 사과나무 검은가지마름병 원인균), 어위니아 캐로토보라(*Erwinia amylovora*, 사과나무 화상병 원인균), 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디아(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, 키위 궤양병 원인균), 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, 오이 반점세균병 원인균), 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, 복숭아 세균성구멍병 원인균), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*, 감귤 궤양병 원인균), 잔토모나스 유베시카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*, 고추 세균성점무늬병 원인균), 잔토모나스 오리제 패소바 오리제(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 벼 흰잎마름병

원인균) 및 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*, 토마토 세균성썩마름병 원인균))과 1종의 그람양성세균(클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 토마토 궤양병 원인균))을 이용하여 실험을 수행하였다.

- [62] -80°C에 저장되어 있던 각 식물병원성 세균을 30% 글리세롤 용액에 현탁한 후 TSA 배지에 스트리킹하여 최적조건에서 배양하였다. 시험관에 TSB 5 ml을 넣어 입구를 면전(cotton plug)으로 막고 멸균한 후, 배양시킨 각 식물병원성 세균 균주 콜로니 하나를 루프로 긁어 멸균한 TSB에 접종하였다. 150 rpm으로 각 세균의 최적 성장조건에서 진탕배양하였다. 세균의 최적 성장조건은 하기 표 2와 같다.

- [63] [표2]

항세균활성 검정에 사용된 다양한 식물병원성 세균의 최적 성장조건

식물병원성 세균	배지	온도(°C)	배양일(day)	
그람음성 세균(Gram-negative bacteria)				
Acidovorax avenae subsp. cattleyae	TSA, TSB	30	1	
Acidovorax konjaci				
Agrobacterium tumefaciens				
Burkholderia glumae				
Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum				
Pectobacterium chrysanthemi				
Erwinia pyrifoliae				
Erwinia amylovora				
Pseudomonas syringae pv. actinidiae				25
Pseudomonas syringae pv. lachrymans				30
Xanthomonas euvesicatoria		28	2	
Xanthomonas arboricola pv. pruni				
Xanthomonas axonopodis pv. citri		30		
Xanthomonas oryzae pv. oryzae				
Ralstonia solanacearum				
그람양성 세균(Gram-positive bacteria)				
Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	TSA, TSB	30	2	

[64]

[65] **3-2. 96-웰 마이크로플레이트 생물검정법을 이용한 인 비트로(*in vitro*)**
항세균활성 조사

[66] 실시에 3-1에서 액체배양한 식물병원성 세균은 UV 스펙트로포토메타를 사용하여 OD값을 0.1로 조정한 후, TSB로 희석하여 10^6 CFU/ml로 맞추고 96-웰 마이크로플레이트에 접종하였다.

[67] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 배양여액은 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 배양액으로부터 원심분리 및 0.2 μ m의 여과지(membrane filter)를 이용한 여과에 의하여 수득되었다.

[68] 그람음성 및 양성을 포함하는 16개의 다양한 식물병원성 세균이 접종된 TSB 배지에 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 배양여액은 최고농도 10%(v/v)이 되도록 하고, 실시에 2의 PGP 복합물질(Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피에서 80% 에탄올로 용출하여 획득한 물질로서 펠지펩틴 4개의 물질을 모두 포함하고 있음)과 대조약제 스트렙토마이신 설페이트(Streptomycin sulfate) 및 옥솔린산(Oxolinic acid)을 각각 최고농도 200 μ g/ml이 되도록 한 후, 다음 웰부터 옥타피펫을 사용하여 2배씩 순차적으로 농도를 낮추었다. 음성대조구로 1% 메탄올을 사용하였으며 실험은 3회 반복 수행하였다. 최적 생장조건에서 정지배양한 후 식물병원성 세균의 생육은 마이크로플레이트 리더(iMark, Bio-Rad)에서 595 nm의 흡광도로 측정하였고, 표 3과 같이 최소 생육저해 농도값(MIC)을 결정하였다.

[69] [표3]

페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양여액 및 PGP 복합물질의 다양한 식물병원성 세균에 대한 최소 생육저해 농도(MIC)

식물병원성 세균	최소 생육저해 농도(MIC)			
	JCK-5075		스트렙토마이신 설페이트 (ug/ml)	옥솔린산 (ug/ml)
	배양여액 (%, v/v)	PGP 복합물질 (ug/ml)		
<i>c. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	1.25	12.50	>200.00	0.05
<i>A. konjaci</i>	2.50	25.00	6.25	0.78
<i>A. tumefaciens</i>	0.63	6.25	200.00	0.78
<i>B. glumae</i>	10.00	100.00	12.50	0.10
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	10.00	100.00	12.50	0.10
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	2.50	25.00	12.50	1.56
<i>P. chrysanthemi</i>	5.00	50.00	>200	0.10
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	10.00	100.00	12.50	3.13
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	10.00	100.00	12.50	1.56
<i>R. solanacearum</i>	10.00	100.00	6.25	0.19
<i>X. euvesicatoria</i>	0.63	6.25	50.00	0.10
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	0.31	3.13	12.50	0.39
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	0.63	6.25	50.00	0.78
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	0.63	6.25	6.25	0.78
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	2.5	12.5	3.125	0.39
<i>Erwinia amylovora</i>	1.25	6.25	3.125	0.39

[70] 표 3에서 확인할 수 있듯이, 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 항세균활성을 조사한 결과, 총 16개의 식물병원성 세균이 배양여액과 PGP 복합물질에 의해 생장이 저해되었다. 복숭아나무 세균성구멍병의 원인균인 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)의 생장이 강하게 억제되었으며, 최소 생육저해 농도값(MIC)은 각각 0.31%, 3.13 ug/ml이었다. 시험에 사용된 아그로박테리움 튜메페시언스와 모든 잔토모나스(*Xanthomonas*) 속 식물병원성 세균은 JCK-5075 균주의 배양여액과 PGP 복합물질에 의해 매우

강하게 억제되었다.

- [71] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주로부터 분리한 항세균활성 물질인 PGP-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D의 항세균 활성을 조사한 결과, 총 16개의 식물병원성 세균이 배양여액과 펠지펩틴에 의해 생장이 저해되었다.

- [72] [표4]

페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주로부터 분리한 펠지펩틴(PGPs)의 다양한 식물병원성 세균에 대한 최소 생육저해 농도(MIC)

식물병원성 세균	최소 생육저해 농도(MIC, ug/ml)			
	PGP-A	PGP-B	PGP-C	PGP-D
<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	8	32	8	8
<i>A. konjaci</i>	16	32	8	16
<i>A. tumefaciens</i>	8	16	4	4
<i>B. glumae</i>	>32	>32	32	32
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	16	>32	32	32
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	16	>32	32	32
<i>P. chrysanthemi</i>	16	32	32	32
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	32	>32	32	32
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	32	>32	32	32
<i>R. solanacearum</i>	32	>32	32	32
<i>X. euvesicatoria</i>	4	16	2	4
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	2	8	2	2
<i>X. citri</i>	4	16	4	4
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	4	16	4	4
<i>E. pyrifoliae</i>	16	>64	16	32
<i>E. amylovora</i>	4	32	4	8

- [73] PGP-A는 벼 세균성알마름병의 원인균인 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*)를 제외한 나머지 세균들에 대해 생장을 억제시켰으며, PGP-C 및 PGP-D는 16개의 식물병원성 세균 모두에 대하여 생장을 저해하였다. 시험에 사용된 모든 잔토모나스(*Xanthomonas*) 속 식물병원성 세균은 펠지펩틴에 의해 강하게 억제되었으며, PGP-A, PGP-C, PGP-D는 잔토모나스 아보리콜라 페소바 프루니에 대한 최소 생육저해 농도값이 2 ug/ml로 나타났다.

- [74]

- [75] 실시예 4: 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액 및 펠지펩틴의

토마토 풋마름병에 대한 인 비보(*in vivo*) 방제효과 평가

[76] **4-1. 식물체 준비**

[77] 토마토 풋마름병의 원인균인 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 방제활성을 조사하기 위해 서광(팜한농) 토마토 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조한 상업용 원예 상토로 채워진 플라스틱 컵(직경 6 cm)에 파종하여 광주기 12시간을 주어 재배하였다. 3엽기나 4엽기의 토마토를 처리 24시간 전에 직경 7.5 cm의 플라스틱 컵에 이식하였다.

[78]

[79] **4-2. 시료 처리**

[80] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 배양액은 증류수를 이용하여 5, 10 및 20배 희석하였고, 트윈 20(Tween-20)을 최종농도 250 ug/ml 수준이 되도록 첨가하였다. PGP-C는 최종 부피의 5% 정도의 메탄올로 용해한 후에 200, 100 및 50 ug/ml이 되도록 증류수로 희석하였다. 무처리구는 트윈 20이 250 ug/ml 수준으로 첨가된 용액을 처리하였으며, 대조약제로는 일품 농약(활성성분: oxolinic acid 20% WP, 동방아그로, 대한민국)을 1,000배 희석하여 처리하였다. 모든 처리구는 포트 하나 당 20 ml씩 토양관주 처리하였다.

[81]

[82] **4-3. 인 비보(*In vivo*) 생물검정**

[83] 실시예 4-2의 시료 처리로부터 24시간 후 TSA 배지에서 3일간 배양한 병원균 랄스토니아 솔라나세아룸 콜로니를 멸균수로 수확하여 균 현탁액을 준비하고, 스펙트로포토미터(Bio-Rad)를 사용하여 600 nm에서 OD값을 0.1(10^8 CFU/ml)로 조절한 다음, 균 현탁액을 포트 당 20 ml씩 토양관주 접종하였다. 접종한 식물체를 30°C의 항온 항습실에 두어 24시간 동안 암조건을 유지시켜주었고, 그 후 광주기 12시간, 상대습도 75%를 유지시켜주었으며 10일 후에 발병도를 조사하였다.

[84] 발병도는 0부터 4까지의 지수(0: 증상이 나타나지 않은 것, 1: 한 개의 잎이 시든 것, 2: 2 내지 3개의 잎이 시든 것, 3: 4개 이상의 잎이 시든 것, 4: 완전히 고사한 것)로 나타내었다. 병 방제가는 발병도 값을 식 1에 대입하여 계산하였다.

[85] [식 1]

$$[86] \quad \text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구의발병도}}{\text{무처리구의발병도}}\right) \times 100$$

[87] 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, JCK-5075의 배양액과 PGP-C는 토마토 풋마름병 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 배양액 5배 희석액과 PGP-C 200 ug/ml의 농도에서 대조약제인 일품(86%)과 비슷한 방제효과를 나타냈다. 배양액은 5배, 10배 및 20배 희석하여 처리하였을 때, 각각 방제가 81%, 58% 및 36%가 나타났으며 PGP-C를 200 ug/ml, 100 ug/ml 및 50 ug/ml로 처리하였을 때, 각각 방제가 83%, 56% 및 31%가 나타났다.

[88] 따라서 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 배양액 및 분리한 항세균물질

PGP-C가 토마토 풋마름병에 대하여 우수한 방제효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[89]

[90] 실시예 5. 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액 및 펠지펩틴의 배추 무름병에 대한 인 비보(*in vivo*) 방제효과 평가

[91] 5-1. 식물체 준비

[92] 배추 무름병의 원인균인 껍토박테리움 케로토보륨 아종 케로토보륨(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)에 대한 방제활성을 조사하기 위해 춘광(사카다코리아, 서울, 대한민국) 배추 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조한 상업용 원예 상토로 채워진 플라스틱 컵(직경 6 cm)에 파종하여 광주기 12시간을 주어 재배하였다. 5엽기나 6엽기의 배추를 처리 24시간 전에 직경 7.5 cm의 플라스틱 컵에 이식하였다.

[93]

[94] 5-2. 시료 처리

[95] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주를 TSA에 스트리킹 한 후 30°C에서 3일 동안 정치배양 하였다. 시험관에 TSB 5 ml을 넣어 입구를 면전으로 막고 멸균한 후, 1일간 정치배양한 JCK-5075 균주의 콜로니 하나를 루프에 찍어 접종하였다. 그리고 30°C 150 rpm에서 24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였다. 이후 250 ml 삼각플라스크에 TSB 50 ml을 넣어 입구를 면전으로 막고 멸균한 후, 액체배양한 JCK-5075 균주 1%를 접종하여 3일 동안 진탕배양하였다.

[96] JCK-5075 균주 배양액을 증류수를 이용하여 5, 10 및 20배 희석하였고, 트윈 20을 최종농도 250 ug/ml 수준이 되도록 첨가하였다. 분리한 물질 중 껍토박테리움 케로토보륨 아종 케로토보륨에 대하여 강한 활성을 나타낸 PGP-A는 메탄올로 용해한 후에 200, 100 및 50 ug/ml이 되도록 증류수로 희석하였으며, 메탄올의 최종 농도는 5%였다. 무처리구는 트윈-20이 250 ug/ml 수준으로 첨가된 용액을 준비하였으며, 대조약제로는 일품 농약을 1,000배 희석하여 준비하였다. 모든 처리구는 포트 하나 당 20 ml씩 토양관주 처리하였다.

[97]

[98] 5-3. 인 비보(*In vivo*) 생물검정

[99] 처리 24시간 후 TSA 배지에서 3일간 배양한 병원균 껍토박테리움 케로토보륨 아종 케로토보륨 콜로니를 멸균수로 수확하여 균 현탁액을 준비하고, 스펙트로포토미터(Bio-Rad)를 사용하여 600 nm에서 OD값을 0.1(10^7 CFU/ml)로 조절한 다음, 10 mM의 염화마그네슘을 첨가한 균 현탁액을 포트 당 20 ml씩 토양관주 접종하였다. 접종한 식물체를 30°C의 항온 항습실에 두어 24시간 동안 암조건을 유지시켜주었다 그 후 광주기 12시간, 상대습도 100%를 유지시켜주었고 8일 후 발병도를 조사하였다.

[100] 발병도는 0부터 5까지의 지수(0: 증상이 나타나지 않은 것, 1: 한 개 또는 두

개의 가느다란 병반이 생긴 것, 2: 2개 이상의 가느다란 병반이 생긴 것, 3: 잎에 백화현상이 발생한 것, 4: 잎의 괴사가 발생한 것, 5: 완전히 고사한 것)로 나타내었고, 방제가는 실시예 4-3의 식 1을 사용하여 계산하였다.

[101] 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, JCK-5075의 배양액과 PGP-A는 토마토 풋마름병 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 배양액 5배 희석액과 PGP-A 200 ug/ml 처리구는 대조약제인 일품(89%)과 비슷한 방제효과를 나타냈다. 배양액은 5배, 10배 및 20배 희석하여 처리하였을 때, 각각 방제가 84%, 60% 및 29%로 나타났으며 PGP-A를 200 ug/ml, 100 ug/ml 및 50 ug/ml로 처리하였을 때, 각각 방제가 76%, 53% 및 29%로 나타났다.

[102] 따라서 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 배양액 및 분리한 항세균물질 PGP-A가 배추 무름병에 대하여 우수한 방제효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[103]

[104] 실시예 6. 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주 배양액 및 펩티펩틴의 고추 세균성점무늬병에 대한 인 비보(*in vivo*) 방제효과 평가

[105] 6-1. 식물체 준비

[106] 고추 세균성점무늬병의 원인균인 잔토모나스 유베지카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*)에 대한 방제활성을 조사하기 위해 조생신탭(농우바이오, 대한민국) 고추 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조한 상업용 원예 상토로 채워진 플라스틱컵(직경 6 cm)에 파종하여 광주기 12시간을 주어 재배하였다. 5엽기나 6엽기의 고추를 처리 24시간 전에 직경 7.5 cm의 플라스틱 컵에 이식하였다.

[107]

[108] 6-2. 시료 처리

[109] 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 배양액은 증류수를 이용하여 5, 10 및 20배 희석하였고, 트윈 20을 최종농도 250 ug/ml 수준이 되도록 첨가하였다. 무처리구는 트윈 20이 250 ug/ml 수준으로 첨가된 용액을 처리하였으며, 대조약제로는 일품 농약을 1,000배 희석하여 처리하였다. 모든 처리구는 포트 하나 당 5 ml씩 엽면분무 처리하였다.

[110]

[111] 6-3. 인 비보(*In vivo*) 생물검정

[112] 처리 24시간 후 TSA 배지에서 3일간 배양한 병원균 잔토모나스 유베지카토리아 콜로니를 멸균수로 수확하여 균 현탁액을 준비하고, 스펙트로포토미터(Bio-Rad)를 사용하여 600 nm에서 OD값을 0.1(10⁷ CFU/ml)로 조절한 다음, 균 현탁액을 포트 당 5 ml씩 토양관주 접종하였다. 접종한 식물체는 플라스틱 커버를 덮어 상대습도 100%를 유지시켜주었으며, 25°C의 항온 항습실에 두어 24시간 동안 암조건을 유지시켜준 후 광주기 12시간을 주어 16일 후에 발병도를 조사하였다.

[113] 발병도는 0부터 7까지의 지수(0: 증상이 나타나지 않은 것, 1: 무병징, 2: 일부

소엽에 괴사성 병반이 나타난 것, 3: 일부 잎에 병반이 합쳐진 것, 4: 많은 잎에 병반이 합쳐진 것, 5: 많은 소엽에 병반이 발생한 것, 6: 심각한 병반과 낙엽이 발생한 것, 7: 식물체가 고사한 것)로 나타내었다. 병 방제가는 실시예 4-3의 식 1을 사용하여 계산하였다.

[114] 도 4에서 확인할 수 있듯이, JCK-5075의 배양액은 고추 세균성점무늬병 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 배양액 5배 희석액은 대조약제인 일품과 비슷한 방제효과를 나타냈다. 배양액은 5배, 10배 및 20배 희석하여 처리하였을 때, 각각 방제가가 67%, 51% 및 37%가 나타났으며 대조약제인 일품은 76%의 방제가가 나타났다.

[115] 따라서 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075의 배양액이 고추 세균성점무늬병에 대하여 우수한 방제효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[116] 본 발명은 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물, 이의 제조방법 및 식물세균병 방제 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 항세균활성을 갖는 페니바실러스 엘지아이 JCK-5075 균주의 배양액 및 이로부터 분리한 펠지펩틴(Pelgipeptins)에서 확인된 식물세균병 원인균에 대한 방제 효과에 관한 것이다.

[117]

1

국제용 양식
원기탁에 관한 수령
규정 7.1 에 따른 발행

수신: 전남대학교 산학협력단
전남대학교 산학협력단
77, 용봉로, 북구, 광주 (우)61186
대한민국

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Penibacillus elgii</i> JCK-5075	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 14196BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I 에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치 (직용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁 받고, 2020 년 6 월 2 일 수령하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 I.에 표시된 미생물은 본 국제기탁기관에 에 수탁되었고, 원 기탁의 부다페스트조약에 의한 기탁으로의 변환 요청이 에 수령되었다.	
V. 국제기탁기관	
명 칭: 생물자원 센터 주 소: 한국생명공학연구원(KRIBB) 181, 임진길, 정읍시, 전라북도 (우)56212 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 김성건, 센터장 날짜: 2020 년 6 월 2 일

FORM BP/4 (KCTC Form 17)

단일 페이지

청구범위

- [청구항 1] 항세균활성을 갖는 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주.
- [청구항 2] 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레애(*Acidovorax avenae subsp. cattleyae*), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*), 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라(*Pectobacterium carotovora subsp. carotovora*), 펙토박테리움 크리스산쉴레미(*Pectobacterium chrysanthemi*), 어위니아 피리폴리아에(*Erwinia pyrifoliae*), 어위니아 캐로토보라(*Erwinia amylovora*), 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디애(*Pseudomonas syringae pv. actinidiae*), 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스(*Pseudomonas syringae pv. lachrymans*), 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola pv. pruni*), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리(*Xanthomonas campestris pv. citri*), 잔토모나스 유베시카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*), 잔토모나스 오리제 패소바 오리제(*Xanthomonas oryzae pv. oryzae*), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*) 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것인, 식물세균병 방제용 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 추출물은 PGP(Pelgipeptin)-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상을 함유하는 것인, 식물세균병 방제용 조성물.
- [청구항 5] 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주를 배양하여 배양액을 제조하는 배양 단계를 포함하는 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레애(*Acidovorax avenae subsp. cattleyae*), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*), 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라(*Pectobacterium carotovora subsp. carotovora*), 펙토박테리움 크리스산쉴레미(*Pectobacterium chrysanthemi*), 어위니아 피리폴리아에(*Erwinia pyrifoliae*), 어위니아 캐로토보라(*Erwinia amylovora*), 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디애(*Pseudomonas syringae pv.*

actinidiae), 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*), 잔토모나스 유베시카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*), 잔토모나스 오리재 패소바 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*) 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것인, 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법.

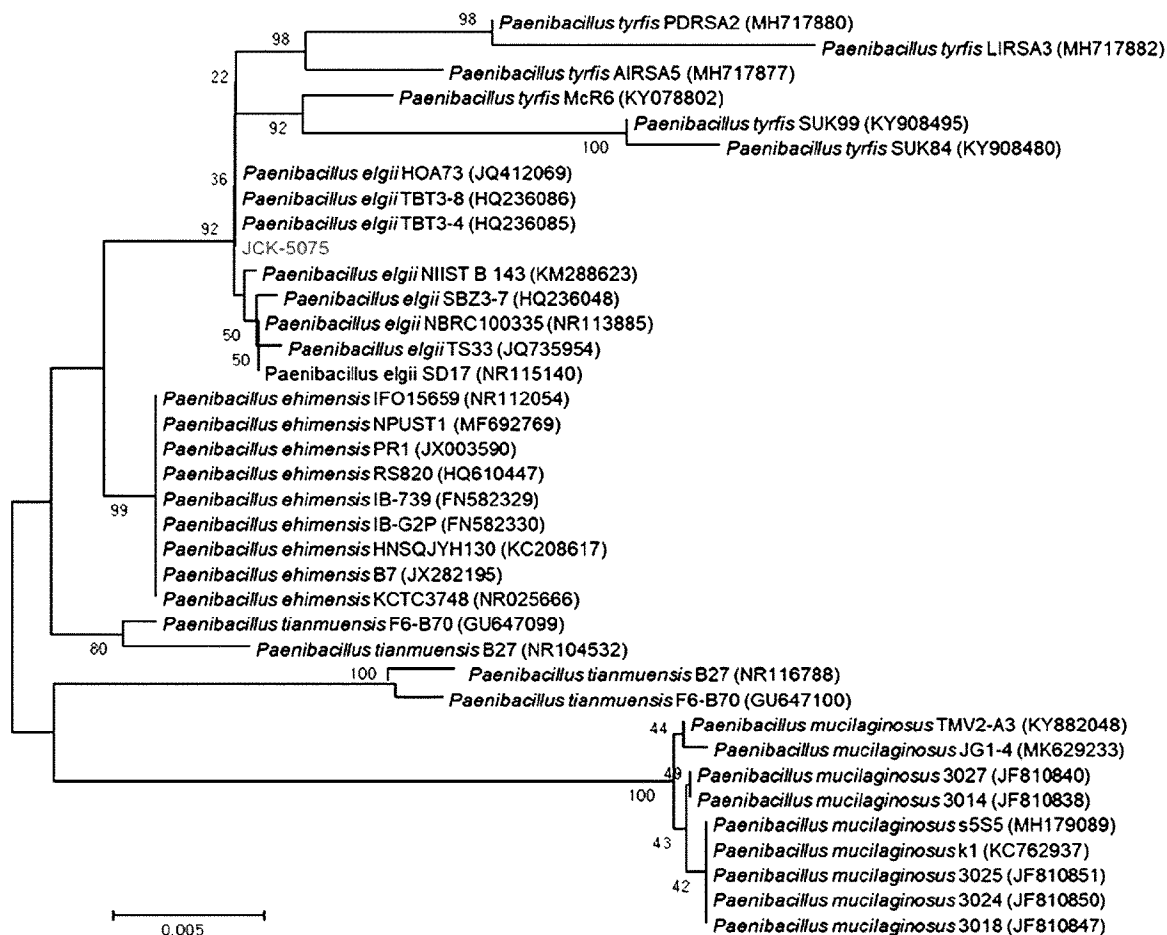
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 방법은 다음과 같은 분획 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법:
이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 배양액으로부터 제1 활성분획을 획득하는 제1 분획 단계; 및
고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 제2 활성분획을 획득하는 제2 분획 단계.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 제1 분획 단계는 증류수:에탄올 = 100~0:0~100의 농도구배에 따라 전개하여 수행되는 것인, 식물세균병 방제용 조성물의 제조방법.
- [청구항 9] 기탁번호 KCTC 14196BP로 기탁된 페니바실러스 엘지아이(*Penibacillus elgii*) JCK-5075 균주의 배양액 또는 이의 추출물을 포함하는 식물세균병 방제용 조성물을 식물체에 처리하는 처리 단계를 포함하는 식물세균병 방제 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 식물세균병은 아시도보락스 아베네 아종 카틀레애(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 벌크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*), 펙토박테리움 카로토보라 아종 카로토보라(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*), 펙토박테리움 크리스산쉴미(*Pectobacterium chrysanthemi*), 어위니아 피리폴리아에(*Erwinia pyrifoliae*), 어위니아 캐로토보라(*Erwinia amylovora*), 슈도모나스 시린개 패소바 액티니디아에(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*), 슈도모나스 시린개 패소바 라크리만스(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), 잔토모나스 아보리콜라 패소바 프루니(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), 잔토모나스 캄페스트리스 패소바 시트리(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*), 잔토모나스 유베시카토리아(*Xanthomonas euvesicatoria*), 잔토모나스 오리재 패소바 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*) 및 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 원인균으로 하는 것인, 식물세균병 방제 방법.

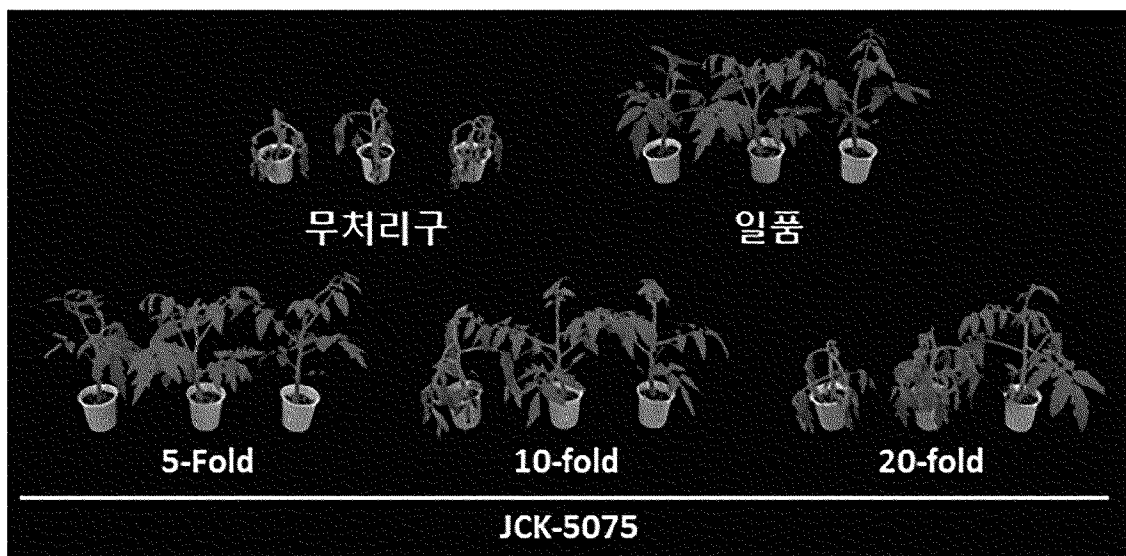
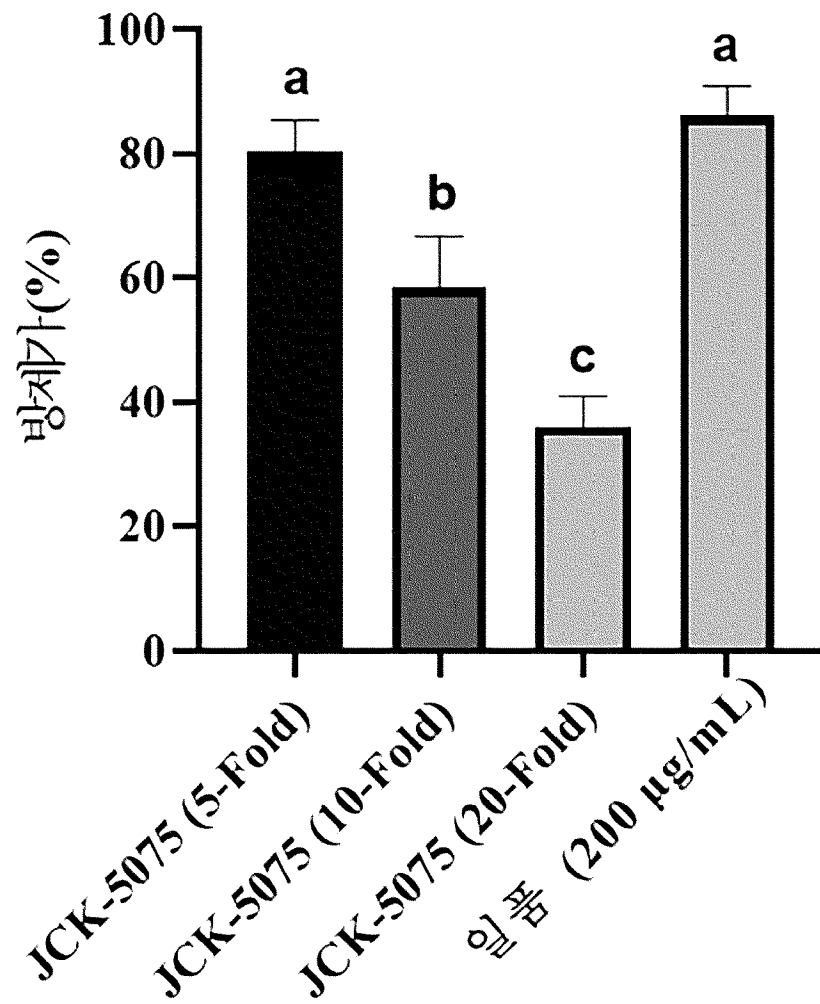
[청구항 11] 제9항에 있어서, 추출물은 PGP(Pelgipeptin)-A, PGP-B, PGP-C 및 PGP-D로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 함유하는 것인, 식물세균병 방제 방법.

[청구항 12] 제9항에 있어서, 처리 단계는 토양관주, 토양관수, 엽면분무, 수간주사, 경엽 처리, 근권 처리 및 종자 처리로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방식으로 수행되는 것인, 식물세균병 방제 방법.

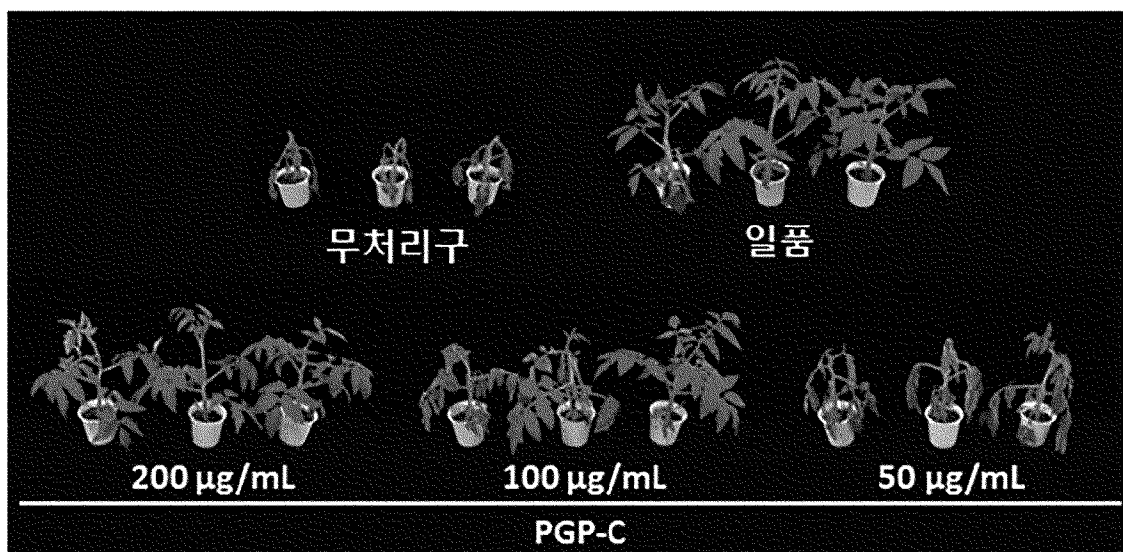
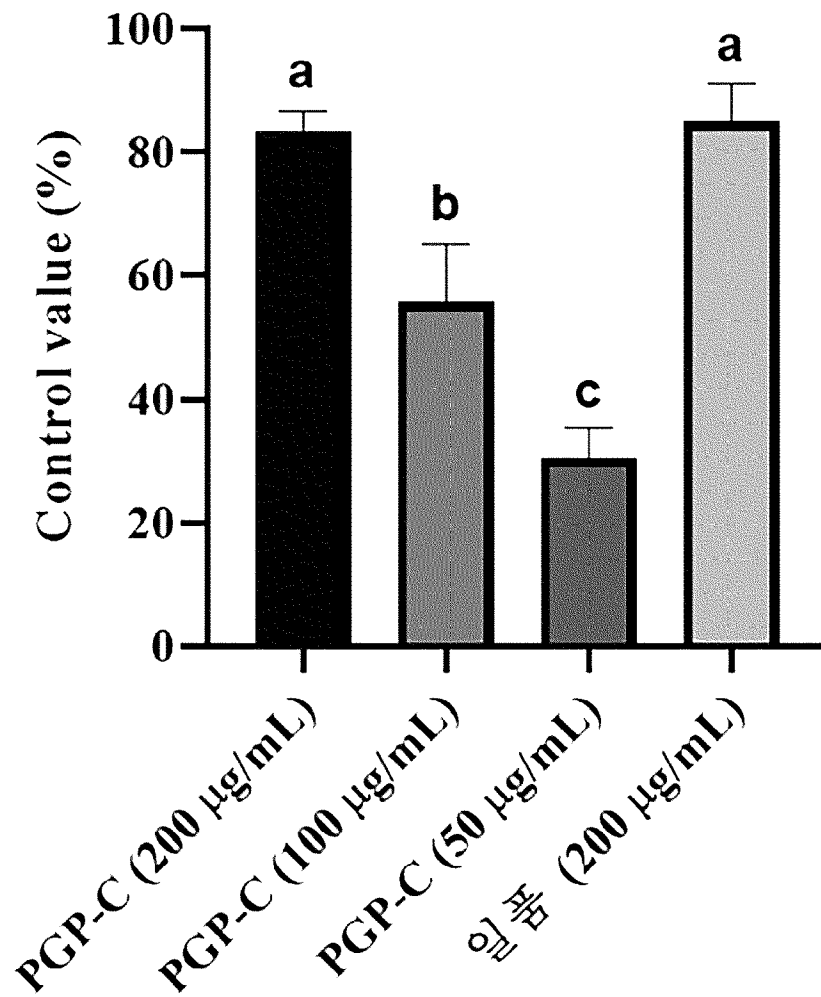
[도 1]



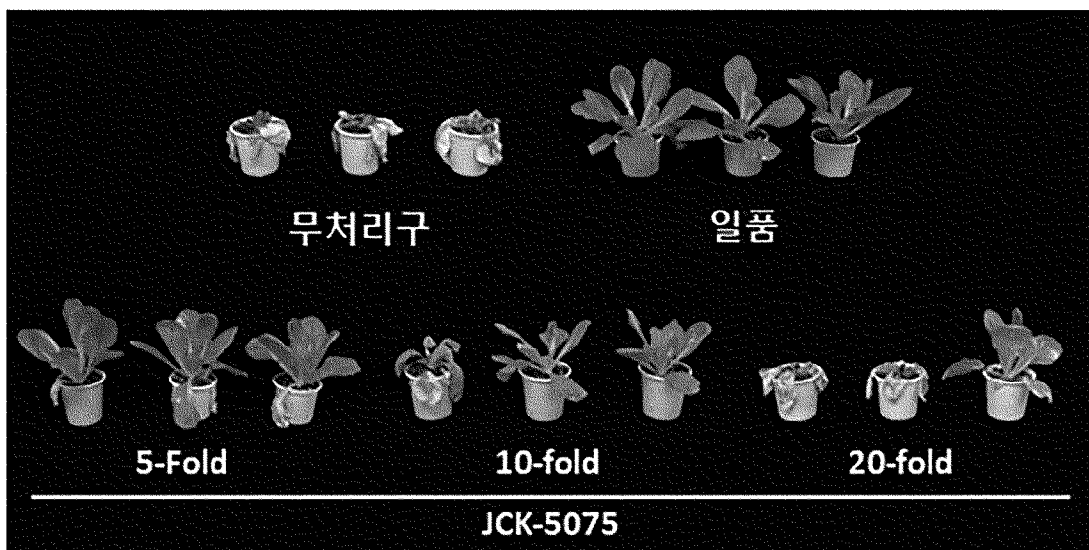
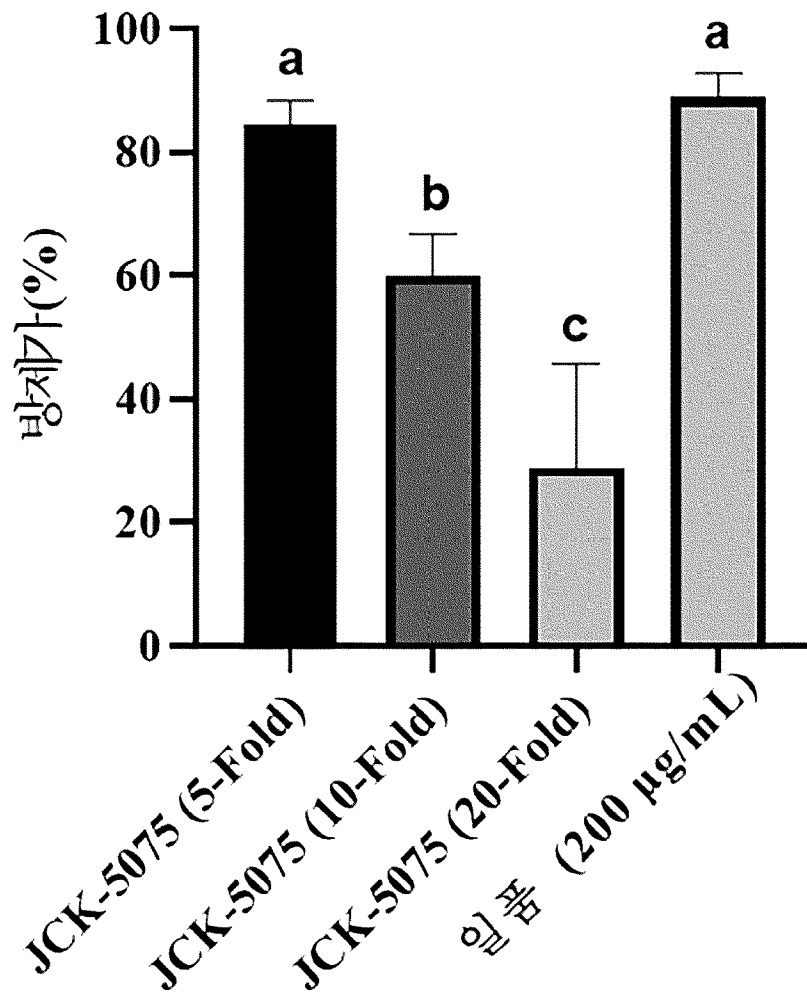
[도2a]



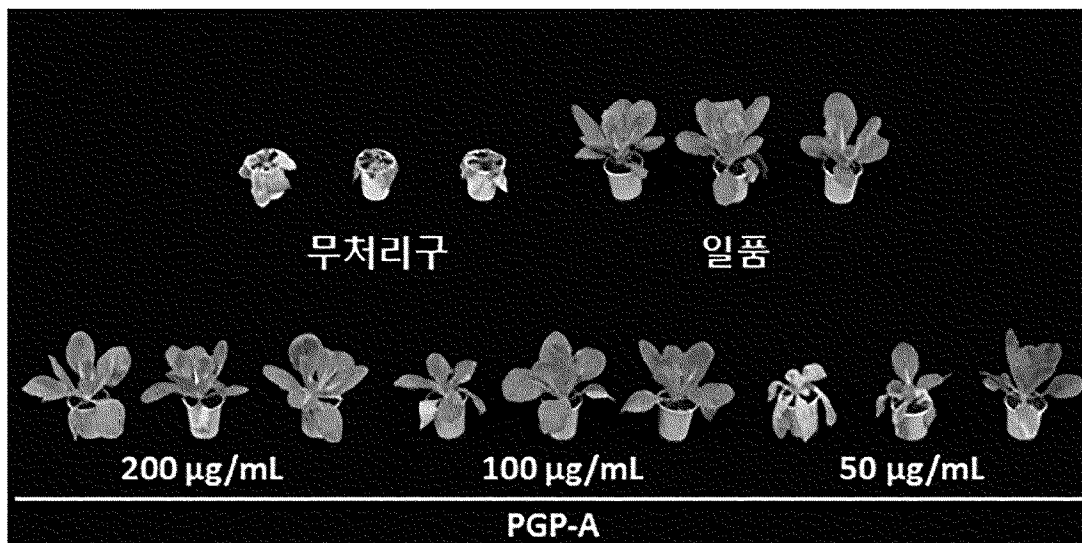
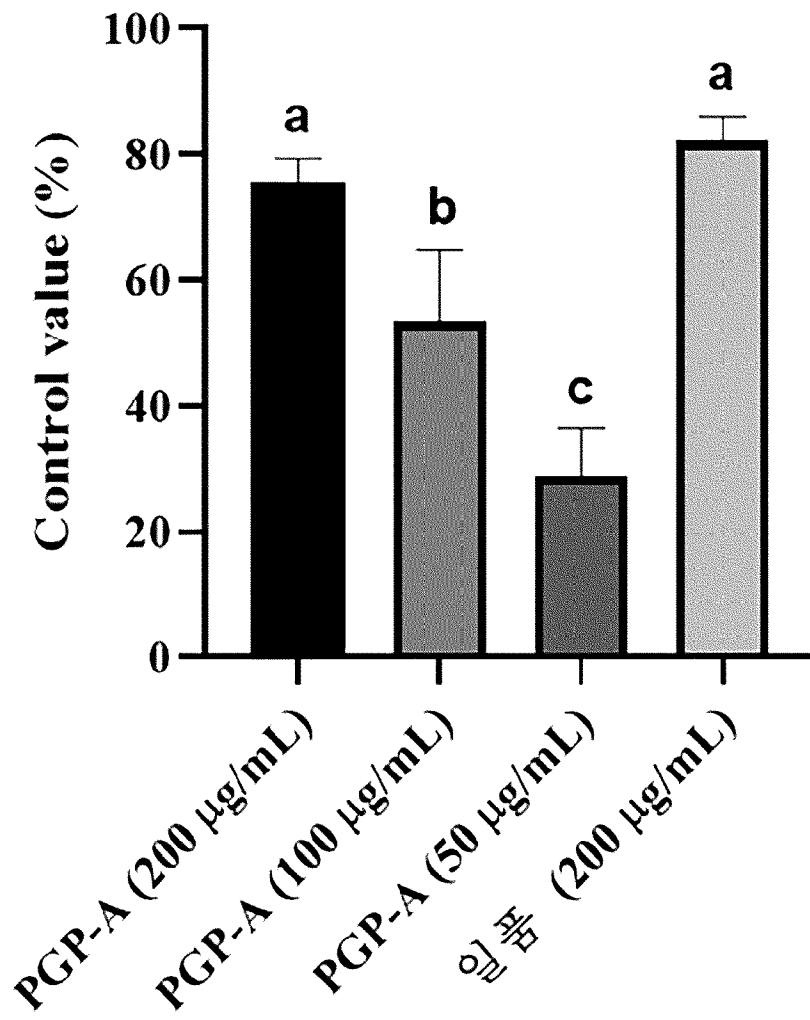
[도2b]



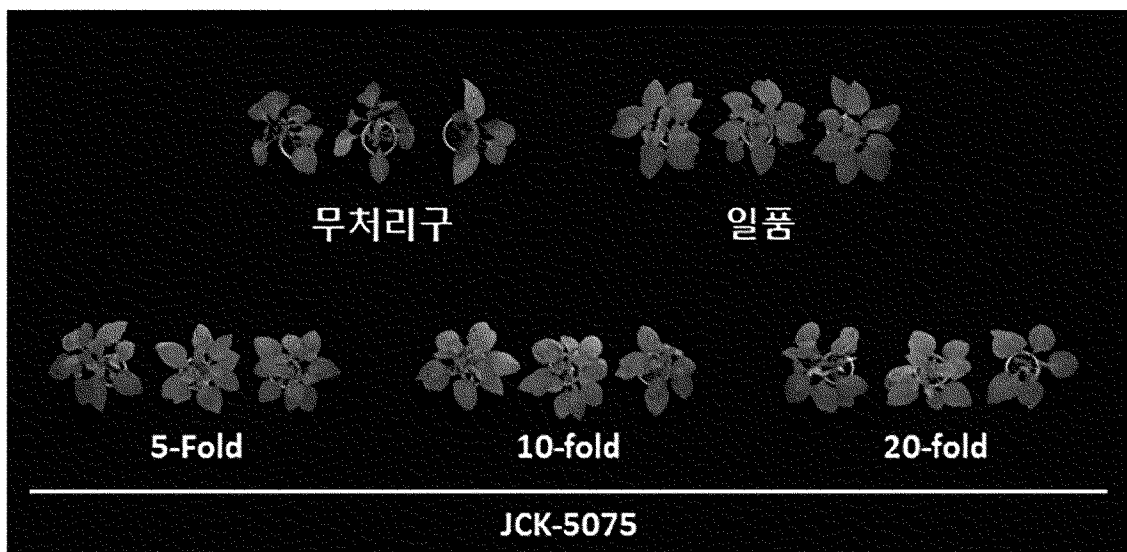
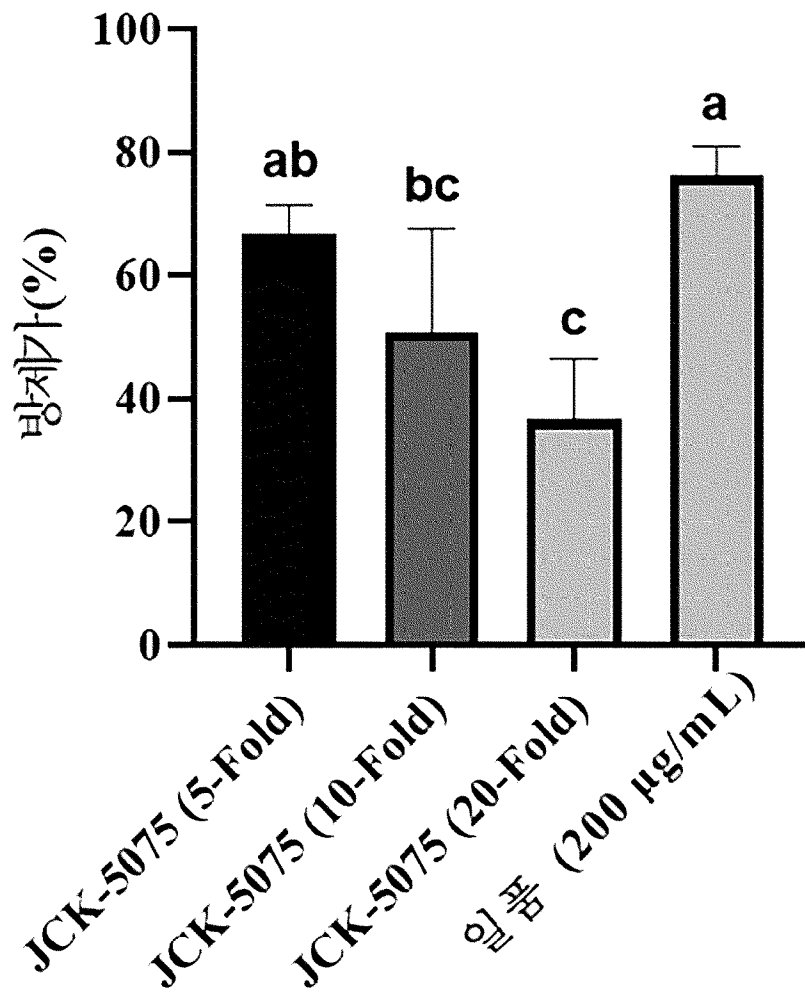
[도3a]



[도3b]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/20(2006.01)i; A01N 63/25(2020.01)i; C12R 1/01(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/20(2006.01); A01G 13/00(2006.01); A01N 63/02(2006.01); A61K 38/12(2006.01); C07K 7/64(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 페니바실러스 엘지아이(Paenibacillus elgii), 식물세균병(plant bacterial diseases), 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KIM, D.-S. et al. Paenibacillus elgii sp. nov., with broad antimicrobial activity. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004, vol. 54, pp. 2031-2035. See abstract; and page 2031.	1 2-12
Y	KIM, J. et al. Structure and antifungal activity of pelgipeptins from Paenibacillus elgii against phytopathogenic fung. Pesticide Biochemistry and Physiology. 13 November 2019, vol. 163, pp. 154-163. See abstract; pages 155-156 and 160; and table 1.	2-12
A	KR 10-2018-0023262 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 07 March 2018 (2018-03-07) See entire document.	1-12
A	WO 2019-142963 A1 (ANDONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 25 July 2019 (2019-07-25) See entire document.	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 October 2021		Date of mailing of the international search report 19 October 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008125**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0052752 A (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 22 May 2007 (2007-05-22) See entire document.	1-12
PX	LE, K. D. et al. Biological Control of Tomato Bacterial Wilt, Kimchi Cabbage Soft Rot, and Red Pepper Bacterial Leaf Spot Using <i>Paenibacillus elgii</i> JCK-5075. <i>Frontiers in plant science</i> . 01 July 2020, vol. 11, thesis no.:775, pp. 1-12. See abstract; page 2; and tables 1 and 2.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008125

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008125

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0023262	A	07 March 2018	KR	10-1935816	B1	03 April 2019
WO	2019-142963	A1	25 July 2019	KR	10-2012583	B1	21 August 2019
				KR	10-2019-0090320	A	01 August 2019
				US	2020-0187508	A1	18 June 2020
KR	10-2007-0052752	A	22 May 2007	AT	546517	T	15 March 2012
				BR	PI0514200	A	03 June 2008
				BR	PI0514200	B1	14 July 2015
				CA	2575769	A1	16 February 2006
				CA	2575769	C	30 September 2014
				CN	101018854	A	15 August 2007
				CN	101018854	B	04 May 2011
				EP	1788074	A1	23 May 2007
				EP	1788074	B1	22 February 2012
				ES	2379178	T3	23 April 2012
				JP	4359619	B2	04 November 2009
				MX	2007001335	A	04 July 2007
				US	2007-0248583	A1	25 October 2007
				US	7935335	B2	03 May 2011
				WO	2006-016558	A1	16 February 2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A01N 63/25(2020.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A01G 13/00(2006.01); A01N 63/02(2006.01); A61K 38/12(2006.01); C07K 7/64(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 페니바실러스 엘지아이(Paenibacillus elgii), 식물세균병(plant bacterial diseases), 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	KIM, D.-S. 등, `Paenibacillus elgii sp. nov., with broad antimicrobial activity`, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54권, 페이지 2031-2035 초록; 페이지 2031	1 2-12
Y	KIM, J. 등, `Structure and antifungal activity of pelgipeptins from Paenibacillus elgii against phytopathogenic fung`, Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019.11.13, 163권, 페이지 154-163 초록; 페이지 155-156, 160; 표 1	2-12
A	KR 10-2018-0023262 A (전남대학교산학협력단) 2018.03.07 전체 문헌	1-12
A	WO 2019-142963 A1 (ANDONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 2019.07.25 전체 문헌	1-12
A	KR 10-2007-0052752 A (가켄 세야쿠 가부시키가이샤) 2007.05.22 전체 문헌	1-12
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년10월19일(19.10.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년10월19일(19.10.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	LE, K. D. 등, 'Biological Control of Tomato Bacterial Wilt, Kimchi Cabbage Soft Rot, and Red Pepper Bacterial Leaf Spot Using <i>Paenibacillus elgii</i> JCK-5075', <i>Frontiers in plant science</i> , 2020,07.01, 11권, 논문번호:775, 페이지 1-12 초록; 페이지 2; 표 1, 2	1-12

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0023262 A	2018/03/07	KR 10-1935816 B1	2019/04/03
WO 2019-142963 A1	2019/07/25	KR 10-2012583 B1	2019/08/21
		KR 10-2019-0090320 A	2019/08/01
		US 2020-0187508 A1	2020/06/18
KR 10-2007-0052752 A	2007/05/22	AT 546517 T	2012/03/15
		BR PI0514200 A	2008/06/03
		BR PI0514200 B1	2015/07/14
		CA 2575769 A1	2006/02/16
		CA 2575769 C	2014/09/30
		CN 101018854 A	2007/08/15
		CN 101018854 B	2011/05/04
		EP 1788074 A1	2007/05/23
		EP 1788074 B1	2012/02/22
		ES 2379178 T3	2012/04/23
		JP 4359619 B2	2009/11/04
		MX 2007001335 A	2007/07/04
		US 2007-0248583 A1	2007/10/25
		US 7935335 B2	2011/05/03
		WO 2006-016558 A1	2006/02/16